DIE SEXUALSTOFFE DER MUCORACEAE.
IHRE ABTRENNUNG UND DIE ERKLÄRUNG IHRER FUNKTION.

Auszug
aus der
Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der
Naturwissenschaftlichen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von
Manfred Plempel

Würzburg 1956

Tag der mündl. Prüfung:
23. Juni 1956.

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Die Sexualstoffe der Mucoraceae.
Ihre Abtrennung und die Erklärung ihrer Funktion.

Die Mucorineen sind zum großen Teil heterothallisch.d.h.die betreffende Art ist durch zwei Geschlechter vertreten,die man mangels genügender morphologischer Unterschiede mit (+) und (-)bezeichnet.Als sichere Geschlechtsbestimmung eines Mycels kann nur der Kopulationsversuch angesehen werden,der mit einem bezüglich seines Geschlechts bekannten Stamm zu erfolgen hat.
Kopulation ist zu beobachten,wenn zwei verschieden geschlechtliche Mycelien beim Wachstum auf geeignetem Substrat in unmittelbare bzw. mittelbare Berührung kommen.Dabei treten eine Reihe von Erscheunungen auf,die vom normalen vegetativen Wachstum abweichen:
In der Kopulationszone, wie die Stelle der Berührung zweier verschieden geschlechtlicher Mycelien heißt,wird der Hyphenfilz durch Carotinanreicherung gelb gefärbt.In dieser gelben Zone werden bei Mucor mucedo die morphologisch eigenartigen (+) und (-)Zygophoren ausgebildet,die als Sexualorgane zu werten sind und alsbald zur Kopulation und Zygotenbildung übergehen.Inder Kopulationszone entstehen nie Sporangienträger.
Als Sexualreaktion können angesprochen werden:
1) Lokale,über die Norm hinausgehende Karotinbildung,
2) Entstehen von Zygophoren und Zygoten
und als sekundäre Sexualreaktion
3) das zygotropische Verhalten der Zygophoren.
Der gelegentlich zu beobachtende Hemmungsraum innerhalb der Kopulationszone ist auf Nährstoffmangel zurückzuführen und nicht als Sex.-Reaktion zu deuten.
Das Ziel der vorliegenden Untersuchung ist die künstliche Auslösung von Sexualreaktion an rein vegetativ wachsenden Mycelien heterothallischer Mucorineenvermittels dazu geeigneter Stoffe und die Analyse der Vorgänge während einer Sexualreaktion.

Die Grundlage zur vorliegengen Arbeit lieferte der 1926 von Burgeff gemachte Zelloidin-Membranversuch,durch den bewiesen werden konnte, daß die Sexualreaktion bei Mucorineen durch spezifische Stoffe -Gamone- ausgelöst wird,die durch Membranen zu diffundieren vermögen. Es gelang jedoch nicht,die wirksamen Stoffe vom Pilzmycel abzutrennen.Ebenso konnte über die Stoffnatur der Gamone nichts ausgesagt werden.

Die Gamone.

Burgeff wies 1937 im Anschluss an die Arbeit Kehls auf die Möglichkeit einer Luftinduktion der Sexualreaktion bei Mucorineen hin, d.h. er hielt es für möglich, daß der eine Sexualreaktion auslösende Stoff flüchtig und die Auslösung einer Sexualreaktion eine Luftinduktion sei. Diese Annahme konnte durch mehrere Versuche widerlegt werden. Die eine Sexualreaktion auslösenden und steuernden Gamone wirken insgesamt durch Diffusion im Substrat.

15 Vitamine und 19 Aminosäuren, sowie hydrolysiertes Casein und tryptisch verdautes Pepton ergaben, auf Sexualwirksamkeit geprüft, keine Reaktion.

Bringt man z.B. (+) und (-) Mycelien von Mucor mucedo auf flüssigem Substrat zur Kopulation, muss es möglich sein, die Gamone daraus zu eluieren.

Es war zunächst nicht möglich, Sexualreaktion in flüssigem Medium zu erreichen. Die Mycelien wuchsen in Flüssigkeitskulturen fast ausschl. submers. Dadurch war normale Atmung aufgrund des sehr begrenzten Sauerstoffangebots nicht möglich und durch Gärung konnte offenbar der Energiebedarf für eine Sexualreaktion nicht gedeckt werden. Eine versuchsanordnung, die eine kontinuierliche Durchlüftung dieser Submerskulturen und damit normale Atmung gestattet, hat sich ausgezeichnet bewährt:

In einer Gaswaschflasche mit durchgehendem G4-Sinterfilter (Schott) wird ein faustgroßes Gazeknäuel befestigt und dieses mit je 100 angekeimten (+) und (-) Sporen von Mucor mucedo bzw. Phycomyces blakesleeanus beimpft. Dann wird die Gaswaschflas che zu einem Drittel mit Pepton-Fleischwasser-Dextrose-Nährlösung nach Sabourroud beschickt und mit einem kontinuierlichen, keimfreien Luftstrom durchlüftet.

Die stark eiweißhaltige Nährlösung bildet beim Durchleiten derart fein verteilter Luft eine etwa 10 bis 15 cm hohe Schaumzone, in der sich das beimpfte Gazeknäuel befindet. Alsbald findet auf dem Gazeträger normale Kopulation s tatt. Die sich entwickelnden Mycelien färben sich aufgrund der Sexualreaktion intensiv gelborange. Nach 4 bis 5 Tagen kann der Versuch abgebrochen werden. Die noch verhandene Nährlösung ist mit Gamonen stark angereichert und ergibt - nach vorhergehender Filtration durch ein bakteriendichtes Filter - im Lochtestverfahren getestet, beim isolierten (+) und (-) Mycel maximale Sexualreaktion.

Mit dieser Methode lassen sich beliebige Mengen gamonhaltiger Nährlösung darstellen.
Es ließ sich weiterhin zeigen, daß Gamone von Mucor mucedo auch bei Phycomyces und Rhizopus Sexualorganbildung auslöden und umgekehrt.
Die Feststellung Burgeff's bezüglich der nicht spezifischen Wirksamkeit der Sexualstoffe bei Mucorineen, die er aus einer großen Zahl "illegitimer Kopulationen" zwischen verschiedenen Mucorineenarten und Gattungen herleitete, konnte damit von der stofflichen Seite aus bestätigt werden.
Für die Ausbildung von Sexualorganen bei Mucorineen sind mindestens zwei Gamone nötig, ein (+) und ein (-) Gamon, die jeweils beim Sexualpartner Sexualorganbildung hervorrufen. Bei geeigneter Versuchsanordnung gelingt es, diese beiden Gamone getrennt, d.h. einmal das (+) und einmal das (-) Gamon in der Nährlösung zu erhalten.

Der Zygotropismus.

Der in der Einleitung als sekundäre Sexualreaktion zwischen (+) und (-) Mycelien angeführte Zygotropismus äußert sich in der Weise, daß sich (+) und (-) Mycelien-Zygophoren so aufeinander zukrümmen, daß im günstigsten Falle Spitzenkontakt eintritt, in dessen Verlauf von beiden Sexualorganen Suspensoren abgegliedert werden, zwischen welchen durch Querwandlösung eine Zygote entsteht.
Diesem Verhalten der Zygophoren muß ein stofflicher, chemotropisch angreifender Reiz zugrunde liegen.
Aus der Literatur sind folgende Versuche zum Zygotropismus bekannt:
Blakeslee (1904) beobachtete, daß zwischen zwei Mycelien von Rhizopus nigricans, die auf freihängenden Substraten kultiviert worden waren, wobei keine Substratberührung gegeben war, Kopulation eintrat und schloß daraus, daß "the influens must lie outside the substratum and in the hyphae affectet".
Burgeff (1924) konnte an seinem Zelloidin-Membran-Versuch beobachten, daß die auf der Oberseite der Membran entstandenen Zygophoren sich zur Membran hinabkrümmten und an der Spitze keulig anschwollen. Sie wurden also vom Untermycel offenbar telemorphotisch gereizt.
Kehl (1936) ließ einen kontinuierlichen Luftstrom über eine kopulierende Petrischalenkultur von Mucor mucedo (+) und (-) streichenund beschrieb eine bemerkenswerte Verschmälerung der Kopulationszone und schloß daraus auf eine Luftinduktion des Zygotropismus.
Banbury (1954) hält den Zygotropismus für eine durch das Substrat wirkende Form des Chemotropismus.
Es war also zunächst der Übertragungsmechanismus des Chemozygotro-

pischen Prinzips zu klären.

Eine Luftinduktion des Zygotropismus im Sinne Kehl's konnte aufgrund mehrerer Versuchsreihen nicht bestätigt werden.

Auch der zygotropischen Reaktion muss ein im Agar diffundierender Stoff zugrunde gelegt werden.

Die Versuche zur Frage des Zygotropismus efgeben Grund zu der Annahme, dass dieselben Gamone, die Sexualorganbildung auslösen, mittels eines Konzentrationsgefälles im Substrat die zygotropischen Reaktionen steuern.

Folgendes Bild der gesamten Sexualreaktion bei Mucor mucedo sei zur Diskussion gestellt:

Treffen zwei verschieden geschlechtliche Mycelien von Mucor mucedo im Verlauf ihres Wachstums aufeinander, werden beide durch gegenseitigen Progamon-Reiz zur Gamonbildung angeregt, wodurch Kontakt-Zygophoren-Bildung auf beiden Seiten einsetzt. Die Hyphen des (+) und (-) Mycels haben sich inzwischen an der Berührungszone dicht verfilzt. Diese Verfilzung der (+) und (-) Hyphen erfolgt vornehmlich i m Nährsubstratund ist im Phasenkontrast-Mikroskop bei Auflicht leicht zu beobachten. Die Zygophoren entstehen etwa 2 bis 3 mm hinter diesen verfilzten Hyphenspitzen. Von beiden Seiten wird fortlaufend (+) bzw. (-) Gamon gebildet und auf kürzestem Wege von den gegenseitig verfilzten Hyphenspitzen aufgenommen. An den Orten starker Verfilzung der Hyphen stehen die Hyphenspitzen unter einem fortgesetzten und kontinuierlich stärker werdenden Gamonreiz. Es ist also ein Reizgradient gegeben. Dieser Reizgradient steuert die Zukrümmung der Kontaktzygophoren so, daß im besten Falle Spitzenkontakt der (+) und (-) Zygophoren und damit Zygotenbildung zustande kommt. Hierbei spielen die (+) Zygophoren eine weitgehend passive Rolle. Ein beträchtlicher Kopulations-Prozentsatz endet infolge Spitzen-Flankenkopulation abortiv.

Beim Zustandekommen einer Sexualreaktion spielen ernährungsphysiologische Momente eine wesentliche Rolle:

Die Stärke einer Sexualreaktion steigt proportional dem im Nährsubstrat angebotenen organischen Stickstoff. So lassen sich auf einem Malzextrakt-Nährboden mit einem Stickstoff-Gehalt von o,o26 gr pro loo ccm Nährlösung Kopulationszonen-Breiten von maximal 1,5 mm erreichen. Auf Sabourroud-Substrat, Stickstoffgehalt o,195 gr pro loo ccm Nährlösung, beträgt die Kopulationszonenbreite 3,5 bis 4 mm.

Bei Versuchen zur chemischen Charakterisierung der Gamone konnten folgende Feststellungen gemacht werden:

1) Die Gamone von Mucor mucedo sind dyalisierbar.
2) Sie sind hitzelabil und werden bei Temperaturen über 8o Grad Celsius sehr rasch inaktiv.
3) Es gelang, das (+) Gamon aus schwach mineralsaurer ,wässriger Lösung mit Benzol zu eluieren.
Die im Folgenden geschilderten Ergebnisse beziehen sich nur auf dass (+) Gamon.
4) Gegen Salzsäure und Laugen ist das Gamon im pH-Bereich 1 bis 12 beständig.Bei Einwirkung von Oxydationsmitteln wird es sofort unwirksam.Kaliumpermanganat-Lösung wird entfärbt,Brom wird addiert,in beiden Fällen wird das Gamon inaktiviert.Von basischen Adsorbentien (Calciumcarbonat,basisches Aluminiumoxyd) sowie von Tierkohle wird das Gamon aus benzolischer Lösung adsorbiert.Das Gamon wird durch Bestrahlen mit der UV-Lampe innerhalb von 5 min.inaktiviert.
5) (+) und (-) Gamone lassen sich nicht unzersetzt destillieren.
Es ist bisher nicht gelungen auch das (-) Gamon aus der Nährlösung zu eluieren.
Weitere Versuche zur Reindarstellung der Mucorineen-Gamone sind im Gange.